

Beiträge zur Technik der
Spermatiefkühlung

Helga Elisabeth Mayer

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München

Vorstand : Professor Dr. W. B a i e r

BEITRÄGE ZUR TECHNIK DER
SPERMATIEFKÜHLUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität München

von
Helga Elisabeth Mayer
aus München

1959



5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan : Professor Dr. K. Zipf

Referent : Professor Dr. W. Baier

Tag der Promotion : 28. Juli 1959

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
Einleitung	1
Material und Methode	2
Eigene Versuche:	
1. Verdünnungsgrad für Tiefkühlperma	4
2. Zeitpunkt der Vorverdünnung	10
3. Verdünnungstemperatur	12
4. Dauer der Vorkühlung (Abkühlgeschwindigkeit von + 25 bis + 5° C)	14
5. Zeitpunkt der Nachverdünnung	17
6. Abschließende Prüfung der Ergebnisse an Hand des Vergleiches von tiefgeköhlten Proben mit normal konserviertem Sperma desselben Ejakulates	19
Zusammenfassung	25
Anhang: Bearbeitungsanleitung für zur Tiefköhlung be- stimmtes Bullensperma	27
Literaturverzeichnis	28



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E I N L E I T U N G

Die Tiefkühlkonservierung des Bullenspermas hat seit ihrer Entdeckung als eine Methode, das Sperma über lange Zeiträume hinweg aufzubewahren und befruchtungsfähig zu erhalten, eine weite Verbreitung erfahren.

Der Tiefkühlprozeß bringt trotz aller Sorgfalt in der Bearbeitung auf jeden Fall eine gewisse Schädigung des Spermas mit sich. Beeinträchtigungen des Spermas können durch Überprüfung der möglicherweise verminderten Zellatmung registriert werden. So können die verschiedenen Verfahren, die bei der Spermatiefkühlung zur Anwendung kommen, auf den Grad ihrer Schädigung hin kontrolliert werden, um die schonendste Arbeitsweise ausfindig zu machen. Der Sauerstoffverbrauch wird nach der Methode von Warburg gemessen. Auf diese Weise haben *Leidl* und *Rüsse* (30) und *Unshelm* (43) bereits einen großen Teil der entscheidenden Faktoren untersucht, und zwar den Natriumgehalt der Verdünner, den Prozentsatz an Eidotter, die Verteilung des Eidotters auf beide Verdünner, den Zusatz des Zweitverdünners, die Abkühlgeschwindigkeit und die Auftautemperatur (letztere in einer noch unveröffentlichten Arbeit von *Leidl*).

Auf diesen Untersuchungen fußend befaßt sich die vorliegende Arbeit mit der Beantwortung der darüber hinaus noch offenstehenden Fragen der optimalen Verdünnungsgrade, des Zeitpunktes und des Temperaturoptimums der Verdünnung, der Abkühlungsgeschwindigkeit von der Verdünnungstemperatur auf die Adaptionstemperatur, des Zeitpunktes der zweiten Verdünnung und endlich einer abschließenden Prüfung der Ergebnisse durch Vergleich von tiefgeköhltem und ohne Tiefkühlung konserviertem Sperma desselben Ejakulates.

Ausgangsbasis für alle Versuche war die von *Eibl*, *Urbaschek* und *Zoder* (16, 17) entwickelte Tiefkühlmethode. In meinen Versuchen wurden die Versuchsergebnisse von *Leidl*, *Rüsse* und *Unshelm* verwendet; sie sind bei der als Standard-Technik beschriebenen Methode einzeln aufgeführt.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E

Für meine Versuche stand mir Sperma von 4 Versuchsbullen der Klinik zur Verfügung; außerdem erhielt ich für die erste und die letzte Versuchsgruppe Samen von den Bullen der Bullenprüfstation Südbayern in Aubing.

Das Sperma wurde sofort nach der Gewinnung wie üblich untersucht und seine Dichte in der Türkischen Zählkammer ausgezählt. Verdünnt und tiefgekühlt wurde nach folgender Methode:

Der erste Verdünner bestand aus 3,2 % Natriumzitrat ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5 + 5,5 \text{ Mol. Kristallwasser, Mol. Gew. } 357,17$) und 40 % Eidotter. Dieser Verdünner wurde langsam und bei Zimmertemperatur zum Sperma zugegeben. Darauf wurde das so verdünnte Sperma in den Kühlschrank gestellt und langsam auf $+5^\circ \text{C}$ abgekühlt. Der Zweitverdünner setzte sich aus 3,2 % Natriumzitrat und 15 % Glycerin (Glyzerinum DAB 6 bzw. Glycerin für Analyse) zusammen. Er wurde, nachdem er im Kühlschrank auf die gleiche Temperatur ($+5^\circ \text{C}$) gebracht worden war, mit gleichfalls abgekühlten Pipetten im Verhältnis 1 : 1 unfraktioniert, aber langsam, zugegeben. Die endgültige Konzentration an Eidotter und Glycerin betrug also im verdünnten Sperma 20 bzw. 7,5 %. Nach einer Adaptionszeit von 10 Stunden begann der Tiefkühlprozeß. 10 ccm des verdünnten Spermas wurden in etwa 15 ccm fassende Gläser abgefüllt, die dann mit paraffinierten Korken verschlossen wurden. Das Tiefkühlen in solchen größeren Gefäßen statt in den üblichen 2-ccm-Samenampullen, die die Arbeit am Warburgapparat zu kompliziert machen würden, hat keinen schädigenden Einfluß auf die Wiederbelebung der Spermien nach dem Auftauen, wie Unshelm feststellte (43). Tiefgekühlt wurde im Alkoholbad durch Zugabe von Trockeneis, und zwar gleichmäßig von $+5^\circ \text{C}$ bis -79°C um je 1 Grad pro Minute. Zur Temperaturkontrolle fand ein Thermoelement mit Lichtstrahlgalvanometer Verwendung, das die nötige Meßgenauigkeit bietet.

Frühestens nach 24 Stunden wurden die einzelnen Proben in Eiswasser bei 0°C aufgetaut. Anschließend begann sofort die Messung des Sauerstoffverbrauchs mit der manometrischen Methode nach Warburg bei einer Temperatur von 38°C und einer Schüttelfrequenz von 80 pro Minute. Diese Arbeitsmethode und die Berechnung der Versuche sind bereits eingehend beschrieben worden (22, 30).

Mit den zur Verfügung stehenden 14 Manometern und Reaktionsgefäßen des Warburgapparates ließen sich in einem Versuch bis zu vier Varianten einer Behandlungsmethode untersuchen; jede Variante mußte in 3 Reaktionsgefäßen geprüft werden, damit ein brauchbares Durchschnittsergebnis erhalten werden konnte. Um die durch atmosphärische Schwankungen bedingten Druckänderungen in den Manometern registrieren und berücksichtigen zu können, liefen stets zwei Manometer ohne Sperma als Kontrollen mit.

Die in einem Versuch überprüften Proben dürfen sich nur in einem einzigen Punkt unterscheiden - das heißt, es muß sich um Spermaproben eines Ejakulates handeln, die in allen Punkten bis auf den zu untersuchenden gleich behandelt worden sind. Dann allerdings lassen sich durch Vergleich der Atmungswerte objektive Aussagen über den Einfluß dieses Punktes auf das Sperma machen. Der Sauerstoffverbrauch der besten Variante wird gleich 100% gesetzt und die übrigen Ergebnisse werden darauf bezogen, so daß die Schädigung, die das Sperma durch die anderen Behandlungsarten erlitten hat, in Prozent ausgedrückt werden kann. Modifizierung dieser Grundtechnik, die durch die besondere Art einer Fragestellung notwendig wurden, werden gesondert geschrieben.

Alle auf diese Weise ermittelten Werte sind relativ. Vergleiche zwischen verschiedenen Ejakulaten sind ebensowenig möglich wie Aussagen über die Qualität oder gar die Befruchtungsfähigkeit eines Spermas - wenn auch ein hoher Sauerstoffverbrauch als Hinweis auf eine gute Qualität betrachtet werden darf (3).

E I G E N E V E R S U C H E

1. Verdünnungsgrad für Tiefkühlsperma

Die Frage nach dem Verdünnungsgrad ist schon von Anfang an eine der wichtigsten in der künstlichen Besamung gewesen. Es geht ja einerseits darum, ein Ejakulat, das im Natursprung auch nur eine Befruchtung zur Folge haben könnte, in möglichst viele einzelne Samenproben aufzuteilen, andererseits aber soll eine möglichst hohe Befruchtungsrate erreicht werden. Für normal konserviertes Sperma ist durch Versuche und Statistiken nachgewiesen, daß höhere Verdünnungsgrade bis zu einer gewissen Grenze keine nennenswerte Verschlechterung der Befruchtungsrate bedingen. R o t t e n s t e e n und A n d e r s e n (37) beobachteten ein Absinken der Befruchtungsrate von etwa 2 %, wenn die Verdünnungsquote verdoppelt wurde, W i l l e t t (47) erhielt mit im Verhältnis 1 : 100 verdünntem Sperma eine Befruchtungsrate von 67,6 % (60 - 90 Tage non-returns) und mit 1 : 300 verdünntem Samen immerhin noch 60,4 %. Eine bedeutende Verschlechterung konnte er erst dann feststellen, wenn die Spermienkonzentration pro ml. unter $4 \cdot 10^6$ sank. In den USA wird im routinemäßigen Besamungsbetrieb auf $10 \cdot 10^6$ lebende Spermien pro ml. verdünnt, wobei man die optimale Fruchtbarkeit für gesichert hält (46).

Bei Tiefkühlsperma scheute man zunächst vor hohen Verdünnungen zurück, da man einen großen Verlust an voll funktionstüchtigen Spermien durch das Gefrieren und Wiederauftauen für unumgänglich hielt. So meinen E i b l und Z o d e r (17), daß man bei der endgültigen Verdünnung selten höher als auf 1 : 10 gehen könne, und auch d e G r o o t und H e n d r i k s e (25) raten, nicht höher als 1 : 15 zu verdünnen.

P o l g e (33) gibt in seinem Vortrag in Wels 1956 den allgemein für Tiefkühlsperma verwendeten Verdünnungsgrad mit 1 : 20 an, räumt aber ein, daß auch viel höhere Verdünnungen schon mit guten Erfolgen angewandt worden sind. Er selbst beschreibt in einer anderen Veröffentlichung Befruchtungsversuche, bei denen die höchste Konzeptionsrate (81,8 %) mit im Verhältnis von 1 : 30 verdünntem Samen erreicht wurde (34). In einem weiteren, gemeinsam mit R o w s o n veröffentlichten Bericht über Befruchtungsversuche mit Tiefkühlsperma stellt er fest, daß Verdünnungen von 1 : 10 bis 1 : 40 keine Reduktion der Befruchtungsrate zur Folge hatten.

L e t a r d und S z u m o w s k i (31) kommen auf Grund von Arbeiten meh-

erer französischer Autoren zu dem Schluß, daß nicht höher als 1 : 100 verdünnt werden sollte.

E m m e n s und M a r t i n (18, 19) verdünnen das zur Tiefkühlung bestimmte Sperma auf eine Dichte von $3 \cdot 10^7$ Spermien pro ml.

Von mehreren Forschern wurde festgestellt, daß dünnere Samenportionen mit guter Bewegung besser zum Tiefkühlen geeignet sind als dichtere. R o w s o n (38) sagt hierzu: daß sich ziemlich dünner Samen mit niedriger Spermienzahl, bei dem die Spermien aber lebhaft beweglich sind, bedeutend zufriedenstellender einfrieren lasse als solcher mit hoher Dichte. Der Grund hierfür sei nicht bekannt.

B r a t t o n und seine Mitarbeiter (8) erhielten bei einem Versuch, in dem die Beweglichkeit von tiefgekühlten Samenportionen beurteilt wurde, die auf $200 \cdot 10^6$ Spermien/ml. bzw. $10 \cdot 10^6$ Spermien/ml. verdünnt worden waren, bei der dünneren Portion ein um 23 % besseres Wiederaufleben.

V a n D e m a r k (46) stellte fest, daß die Beweglichkeit nach dem Auftauen von der Spermienkonzentration im Bereich von $10 - 90 \cdot 10^6$ Spermien/ml nicht beeinflußt wurde; sie schien jedoch in den dünneren Proben etwas besser zu sein. Auch haben Befruchtungsversuche mit tiefgekühltem Samen, der nur $15 \cdot 10^6$ Spermien/ml oder gar noch weniger enthielt, durchaus befriedigende Ergebnisse gebracht (8, 27).

In den folgenden Versuchen sollte festgestellt werden, bei welcher Spermienkonzentration pro ccm tiefgekühltes Sperma den prozentual höchsten Sauerstoffverbrauch aufweist, verglichen mit einer Probe desselben, genau so verdünnten und vorbehandelten, nur nicht der Tiefkühlung unterworfenen Sperma.

Diese Fragestellung machte eine Abwandlung der üblichen Arbeitsmethode am Warburgapparat notwendig. Um nämlich eine Aussage über den Einfluß verschiedener Spermienkonzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch machen zu können, müssen vom gleichen Ejakulat mindestens 3 Proben unterschiedlicher Dichte mit ihren normal konservierten, ebenso dichten Kontrollen verglichen werden. Dies ist wegen der beschränkten Manometerzahl und aus zeitlichen Gründen (der Gefriererfolg soll erst 24 Stunden nach der Tiefkühlung beurteilt werden (17)) nicht in einem Arbeitsgang möglich. Für jeden Versuch waren also zwei Arbeitsgänge am Warburgapparat notwendig: Zuerst die Prüfung der

Kontrollen und dann die der tiefgekühlten Proben.

Die zu den Versuchen herangezogenen Ejakulate wurden folgendermaßen behandelt: Nach der genauen Dichtebestimmung wurde jedes Ejakulat in 4 Portionen aufgeteilt. Diese Einzelproben wurden zuerst mit dem eidotterhaltigen Vorverdünner bei Zimmertemperatur auf das Doppelte der endgültig gewünschten Dichte verdünnt, darauf im Kühlschrank auf $+5^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und dann mit einem gleichen Volumen des ebenfalls auf $+5^{\circ}\text{C}$ gekühlten glyzerinhaltigen zweiten Verdünners versetzt. Da fünf verschiedene Spermienkonzentrationen untersucht werden sollten, waren zwei Versuchsreihen notwendig. In der ersten überprüfte ich die Dichten von etwa 10 000, 25 000, 50 000 und 100 000, in der zweiten 25 000, 50 000, 100 000 und 150 000 Spermien pro mm³ verdünnten Samens.

Ich hatte also für einen Versuch vom gleichen Sperma vier Proben, die sich nur durch ihre Dichte voneinander unterschieden.

Den Prozentsatz an toten Spermien im Ejakulat berücksichtigte ich bei meinen Versuchen nicht; Samen, der überdurchschnittlich viele tote Samenzellen enthält, wird ja schon bei der mikroskopischen Untersuchung auf Beweglichkeit ausgeschieden. Außerdem wäre das Anfertigen und Auszählen von Ausstrichen noch vor dem Verdünnen in der Praxis zu umständlich und zu zeitraubend.

Für diese Versuche mußte ich eine Adaptionszeit von 20 Stunden wählen. Weil jedoch die Schädigung des Spermas durch diese lange Adaptionszeit verhältnismäßig gering ist (43) und die miteinander verglichenen Proben ihr in gleicher Weise ausgesetzt waren, hat dieser Umstand für das Ergebnis keine Bedeutung.

Nach der Adaptionszeit wurde die Hälfte einer jeden der vier Proben tiefgekühlt. Die andere Hälfte prüfte ich sofort anschließend auf ihren Sauerstoffverbrauch.

Bei der Messung des Sauerstoffverbrauches der tiefgekühlten Fraktionen benutzte ich für die Proben mit gleicher Dichte jeweils dieselben Reaktionsgefäße und Manometer wie für die nicht tiefgekühlten, um alle Fehler, die sich durch geringfügige Volumensunterschiede oder durch die Berechnung ergeben könnten, auszuschalten.

Die Ergebnisse errechnen sich aus dem Vergleich des Sauerstoffverbrauches der tiefgekühlten mit dem der nicht tiefgekühlten Proben eines Ejakulates von gleicher Dichte, wobei der O_2 -Verbrauch der nicht tiefgekühlten Proben gleich 100 % gesetzt wurde.

1. Versuchsreihe (Durchschnitt aus 5 Versuchen) :

Spermien/cmm im verd. Samen	O ₂ -Verbrauch in cmm in 2 Stunden	%
10 000 (9 110-10 780)	vor -79° 504 nach -79° 335	66,5
25 000 (24 090-27 840)	vor -79° 248 nach -79° 180	72,6
50 000 (49 000-55 280)	vor -79° 188 nach -79° 134	71,3
100 000 (98 000-101 200)	vor -79° 139 nach -79° 82	59,0

2. Versuchsreihe (Durchschnitt aus 4 Versuchen) :

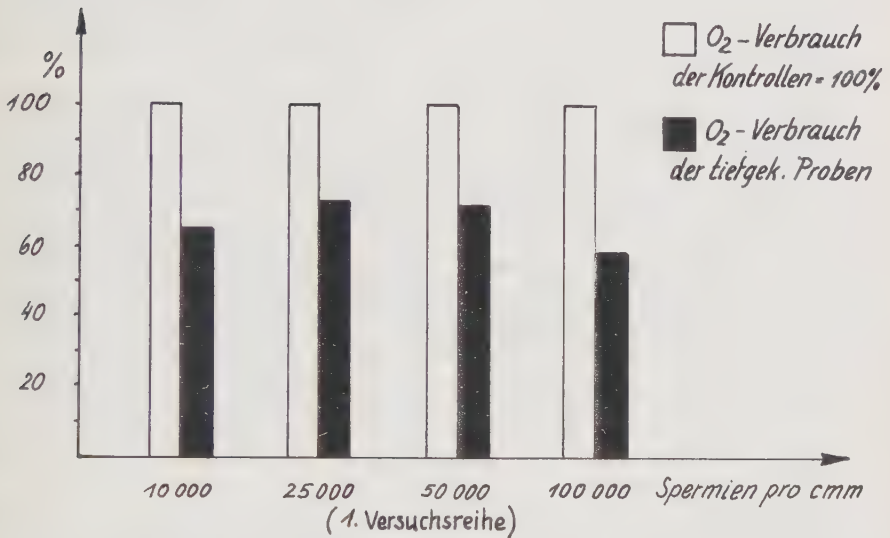
Spermien/cmm im verd. Samen	O ₂ -Verbrauch in cmm in 2 Stunden	%
25 000 (25 400-25 550)	vor -79° 326 nach -79° 287	88,0
50 000 (49 320-51 100)	vor -79° 215 nach -79° 183	85,1
100 000 (101 600-115 700)	vor -79° 182 nach -79° 123	67,6
150 000 (142 200-154 100)	vor -79° 184 nach -79° 117	63,6

Der absolute Sauerstoffverbrauch ist in dieser Versuchsanordnung bei den Proben mit geringster Dichte am höchsten und sinkt mit zunehmender Spermienkonzentration ab. Bei den tiefgeköhlten Fraktionen jedoch geht dieser Abfall nicht parallel mit dem der nicht tiefgeköhlten Fraktionen: die Proben mit einer Spermienkonzentration von etwa 10 000 pro cmm erreichen mit ihrem O_2 -Verbrauch im Durchschnitt 66,5 % der nicht tiefgeköhlten Kontrollen, während die auf 25 000 Spermien pro cmm verdünnten mit 72,6 % (bzw. 88,0 % in der 2. Versuchsreihe) bedeutend besser lagen. Bei 50 000 Spermien/cmm war in beiden Versuchsreihen wieder ein Abstieg auf 71,3 (85,1) % zu verzeichnen. Der Abfall wurde noch deutlicher bei einer Spermienkonzentration von 100 000 pro cmm (59,0 bzw. 67,6 %). Bei der Dichte von 150 000 Spermien/cmm, die nur in der zweiten Versuchsreihe geprüft werden konnte, erreichte der Sauerstoffverbrauch der tiefgeköhlten Proben nur mehr 63,6 % von dem der nicht tiefgeköhlten, was einen Abfall von 4,3 % gegenüber der Dichte von 100 000 Spermien pro cmm bedeutet.

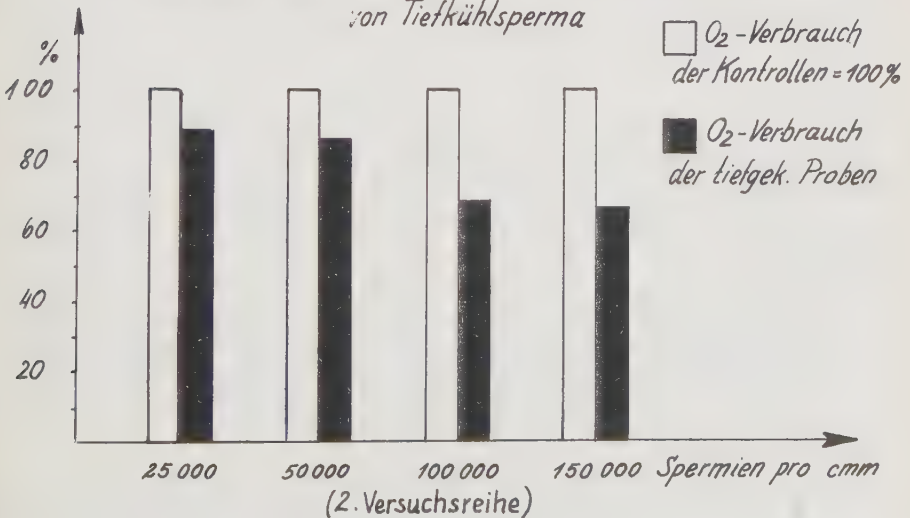
Daraus geht hervor, daß die Spermienkonzentration einen wesentlichen Einfluß auf die Wiederbelebung des Spermas nach dem Auftauen hat, und zwar ist die beste Wiederbelebung bei solchem Samen zu erwarten, der auf etwa 25 000 bis 50 000 Spermien pro cmm verdünnt worden ist.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen graphisch dargestellt.

*Einfluß der Spermienkonzentration auf den O_2 -Verbrauch
von Tiefkühl sperma*



*Einfluß der Spermienkonzentration auf den O_2 -Verbrauch
von Tiefkühl sperma*



In der Praxis sollte also stets mit Rücksicht auf die ursprüngliche Dichte des Ejakulates verdünnt werden; dabei ist eine kolorimetrische Dichtebestimmung durchaus als genügend zu betrachten. Bei der Vorverdünnung ist das Sperma auf 50 000 bis 100 000 Spermien pro cmm einzustellen, so daß die Konzentration nach der zweiten Verdünnung die Hälfte beträgt und damit in dem als optimal ermittelten Bereich liegt.

In meinen späteren Versuchen verdünnte ich auf den zwanzigsten Teil der ursprünglichen Dichte (1 : 19); die als optimal ermittelte Spermienkonzentration wurde dabei allerdings nur selten bei Ejakulaten mit geringer Dichte (etwa 500 000 Spermien pro cmm) erreicht. Meistens lagen die Werte bei 50 000 bis 90 000 Spermien pro cmm (1 000 000 bis 1 800 000 Spermien/cmm im unverdünnten Samen). Höhere Verdünnungsgrade wurden nicht gewählt, weil dann die Fehlermöglichkeiten durch das Abmessen kleinster Spermamengen und durch etwaige Ungenauigkeiten beim Ablesen der dann nur geringen Druckunterschiede der Manometer am Warburgapparat relativ groß sind.

2. Zeitpunkt der Vorverdünnung

Über den Zeitpunkt der Vorverdünnung finden sich in der Literatur verhältnismäßig wenige Angaben, jedoch sind sich alle Autoren darin einig, daß die Verdünnung möglichst unmittelbar nach der Samengewinnung erfolgen soll. E i b l (15) verdünnt gleich im Anschluß an die Samenabnahme. Auch D e m i n a t u s (12) rät, sofort zu verdünnen, damit die Verdünnung 10 - 15 Minuten nach der Gewinnung beendet ist. Nach G r o o t e n h u i s (26) soll die Vorverdünnung innerhalb der ersten halben Stunde nach der Samenabnahme stattfinden. Auf diese Weise soll der Energieverlust, der beim Stehenlassen des unverdünnten Spermas auf jeden Fall eintritt, vermieden werden.

Um nun festzustellen, ob der Sauerstoffverbrauch nach dem Auftauen geringer wird, wenn das zur Tiefkühlung bestimmte Sperma nach verschiedenen langen Zeitspannen nach der Gewinnung verdünnt wird, beziehungsweise wie groß dieser Abfall ist, ging ich nach folgendem Versuchsplan vor:

Wieder wurde ein Ejakulat in vier Portionen aufgeteilt, von denen die erste unmittelbar nach der Abnahme, die zweite nach einer, die dritte nach drei und die vierte nach fünf Stunden verdünnt wurde. Die Verdünnung erfolgte im Was-

serbad von Zimmertemperatur (20 - 25° C) mit dem üblichen Natriumzitat-Eidotterverdünner, der im gleichen Wasserbad auf dieselbe Temperatur gebracht worden war. Verdünnt wurde im Verhältnis 1 : 19 ; zu einem Kubikzentimeter Sperma wurden also 9 ccm Vorverdünner und 10 ccm glyzerinhaltiger Zweitverdünner zugegeben.

Nach dieser ersten Verdünnung stellte ich die Wasserbäder mit den verdünnten Spermaproben in den Kühlschrank, wo sie sich in etwa 2 Stunden auf + 5° C abkühlten. Dann gab ich den Zweitverdünner dazu. Die Adaptionszeit von 10 Stunden, die U n s h e l m (43) als optimal beschreibt, konnte auch bei dieser Versuchsreihe aus zeitlichen Gründen nicht eingehalten werden; sie betrug 8 - 12 Stunden. Ich glaube jedoch, daß diese Schwankungen zu gering sind, um einen Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch der Spermien nach dem Auftauen auszuüben, der groß genug wäre, das Ergebnis zu verschleiern oder gar zu verfälschen.

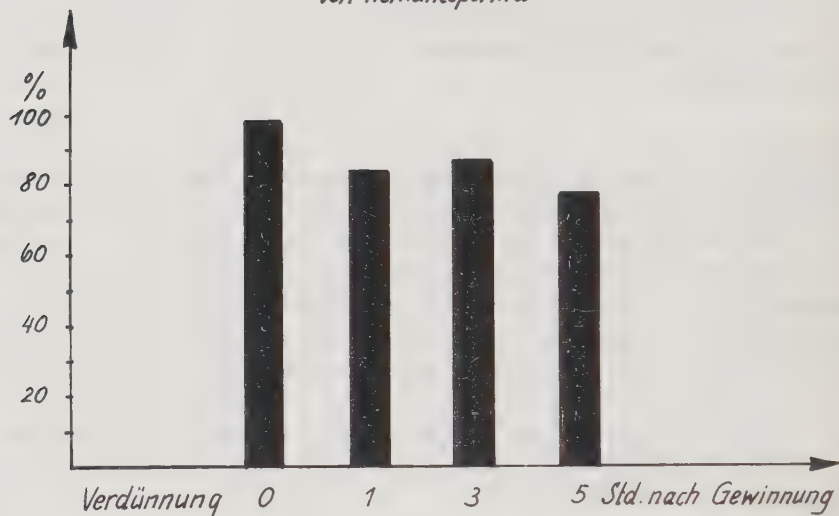
Nach frühestens vierundzwanzig Stunden wurden die Proben im Wasserbad von 0° C aufgetaut und sofort im Warburgapparat auf ihren Sauerstoffverbrauch geprüft.

Durchschnitt aus 4 Versuchen :

Verdünnung	0	1	3	5	Std. nach Gewinnung
O ₂ -Verbrauch in					
ccm in 2 Stunden	152,5	129,2	133,2	119,2	
%	100 %	84,6%	87,3%	78,2%	

Den höchsten Sauerstoffverbrauch wies in allen Versuchen die sofort nach der Abnahme verdünnte Spermaportion auf, was ja auch von vornherein anzunehmen war. Interessant ist, daß der Abfall in der ersten Stunde 15,3 % betrug, während die Werte für die Verdünnung nach 1 bzw. 3 Stunden in etwa gleicher Höhe lagen. Erst die erst 5 Stunden nach der Gewinnung verdünnte Samenprobe zeigte wieder eine deutlich (um 9,1 % gegenüber der nach 3 Stunden verdünnten Probe) verminderte Atmungskapazität.

*Einfluß des Verdünnungszeitpunktes auf den O_2 -Verbrauch
von Tiefkühlsperma*



Es ist also ratsam, unverzüglich nach der Samenabnahme zu verdünnen, um den Energieverlust des Spermas, der schon in der ersten Stunde sehr groß ist, zu vermeiden.

Diese Frage hat für den Routinebetrieb keine Bedeutung; wichtig wird sie erst dann, wenn z. B. Samen eines besonders wertvollen Bullen außerhalb einer Besamungsstation gewonnen und durch Tiefkühlung konserviert werden soll oder wenn die Tiefkühlung zur Untersuchung und Beurteilung eines Ejakulates herangezogen wird. Ist es in einem solchen Fall nicht möglich, schon an Ort und Stelle zu verdünnen, so muß die Zeit, die zwischen Samenentnahmen und Verdünnung verstrichen ist, mit einkalkuliert werden und bei der Prüfung des Gefrierfolges Berücksichtigung finden.

3. Verdünnungstemperatur

Die Verdünnung des Bullenspermas wird meistens in einem Wasserbad bei Zimmertemperatur (20 - 25° C) ausgeführt (12, 17, 46).

De Groot (24) beschreibt Versuche, bei denen er die Vorverdünnung bei $+38^{\circ}\text{C}$, also Körpertemperatur, unternahm. Bratton (9) hält eine Temperatur von $+30^{\circ}\text{C}$ für günstig. Eibl, Urbaschek und Zoder raten in ihrer Veröffentlichung über die Tiefkühlkonservierung des Bullensperma (16) zu einer Verdünnungstemperatur von $+25 - 30^{\circ}\text{C}$. Auch von Ah (2) glaubt, daß eine Verdünnungstemperatur von $+27 - 30^{\circ}\text{C}$ die größte Schonung des Samens gewährleistet. Eibl und Zoder arbeiten auch bei Zimmertemperatur (17). Swanson (41) gibt an, daß der schädigende Einfluß des sogenannten Verdünnungsschockes bei höheren Verdünnungen sich dann verringert, wenn bei etwa $+20^{\circ}\text{C}$ verdünnt wird. Aehnelt (1) erhielt bei Verdünnung mit Spermasol bei $+20^{\circ}\text{C}$ die besten Ergebnisse.

In meinen Versuchen untersuchte ich den Einfluß, den Verdünnungstemperaturen von $+30$, 25 , 20 und 15°C auf den Sauerstoffverbrauch von tiefgekühltem Bullensperma nach dem Wiederaufbau haben.

Zu diesem Zweck wurden die Ejakulate wieder in je 4 Proben aufgeteilt: die erste Probe wurde in einem Wasserbad von $+30^{\circ}\text{C}$, die zweite bei $+25^{\circ}\text{C}$, die dritte bei $+20^{\circ}\text{C}$ und die vierte bei $+15^{\circ}\text{C}$ verdünnt. Der für jede Probe vorgesehene Verdüner hatte längere Zeit Gelegenheit, sich im gleichen Wasserbad der Temperatur anzugleichen. Die Temperatur kontrollierte ich mit Alkoholthermometern sowohl im Wasserbad als auch im verdünnten Sperma selbst. Verdünnt wurde wieder möglichst bald nach der Samengewinnung und in einem Verhältnis von $1 : 19$. Die glyzerinhaltige Verdünnungsfraction setzte ich nach etwa 2 Stunden Abkühlung im Kühlschrank bei $+5^{\circ}\text{C}$ zu. Tiefgekühlt wurde nach 10-stündiger Adaptionszeit.

Durchschnitt aus 4 Versuchen :

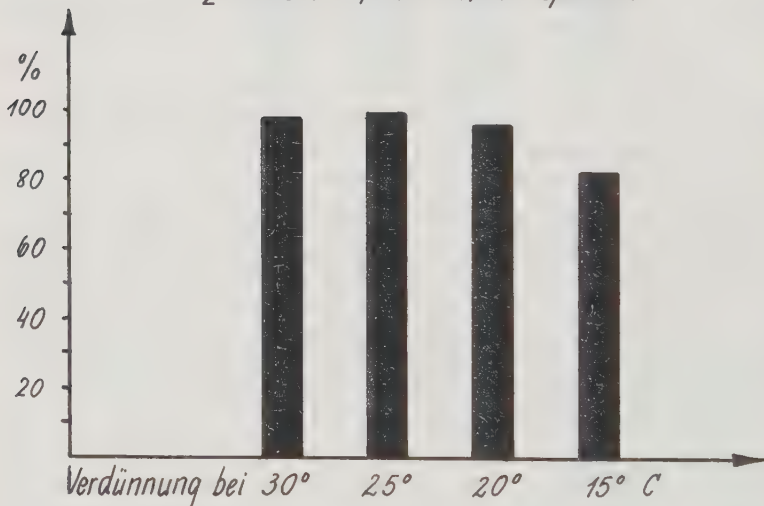
Verdünnung bei	30	25	20	15° C
O ₂ -Verbrauch in c mm in 2 Stunden	157,2	160,2	154,2	130,2
%	98,1%	100 %	96,2 %	81,2 %

Aus diesen Ergebnissen ist zu ersehen, daß bei Verdünnung bei $+30$, 25 und 20°C der Sauerstoffverbrauch des wiederaufgetauten Spermas in etwa gleicher Höhe liegt. Auch wechselten die besten Werte bei den einzelnen Versuchen

zwischen diesen drei Fraktionen, wenn sich auch im Durchschnitt bei $+25^{\circ}\text{C}$ ein etwas höherer Wert ergibt. Ein deutlicher Abfall war erst bei Verdünnung bei $+15^{\circ}\text{C}$ festzustellen, und zwar um 18,8 % im Vergleich zu dem besten, gleich 100 % gesetzten Wert bei $+25^{\circ}\text{C}$.

Daraus folgt, daß dann die geringste Schädigung des zur Tiefkühlung bestimmten Samens zu erwarten ist, wenn die erste Verdünnung bei Temperaturen zwischen $+25$ und 30°C vorgenommen wird. Auch die Verdünnung bei Zimmertemperatur (etwa $20 - 25^{\circ}\text{C}$) dürfte kaum einen bemerkenswerten Abfall der Stoffwechselintensität der Spermien nach dem Auftauen zur Folge haben.

*Einfluß der Verdünnungstemperatur auf den
 O_2 -Verbrauch von Tiefkühlsperma*



4. Dauer der Vorkühlung (Abkühlgeschwindigkeit von $+25^{\circ}\text{C}$ bis $+5^{\circ}\text{C}$).

Es ist bekannt, daß alle plötzlichen Temperaturänderungen eine schockartige Wirkung auf das Sperma ausüben; deshalb muß auch die Abkühlung von der Verdünnungstemperatur auf $+5^{\circ}\text{C}$, also derjenigen Temperatur, bei der sich die Spermien in anabiotischem Zustand befinden und sich während der Adaptionszeit an den glyzerinhaltigen Tiefkühlverdünner anpassen können, sorgfältig und gleichmäßig geschehen.

Die einfachste Methode der Vorkühlung ist wohl die, das Wasserbad mit dem vorverdünnten Sperma in den Kühltank bei $+5^{\circ}\text{C}$ zu stellen und dort der langsamen Abkühlung auf diese Temperatur zu überlassen. Ich glaube jedoch, daß sich, wenn man das Sperma 4 - 6 (P o l g e und R o w s o n 35) oder gar 8 Stunden (Bericht des landwirtschaftlichen Versuchslaboratoriums Kopenhagen, 4) vor der zweiten Verdünnung im Kühltank stehen läßt, schon dadurch eine Minderung der Lebensintensität der Spermien einstellt, die doch nach Möglichkeit vermieden werden soll.

G ö t z e (20) rät für die normale Samenkonservierung, nach der Verdünnung bei Zimmertemperatur in 60 - 90 Minuten auf $+8 - 10^{\circ}\text{C}$ abzukühlen und dann die Temperatur in weiteren 90 Minuten auf $+4 - 6^{\circ}\text{C}$ absinken zu lassen. Die Vorkühlung soll also insgesamt 2 1/2 - 3 Stunden in Anspruch nehmen. Nach V a n D e m a r k (46) soll die Vorkühlung in 1 1/2 - 2 1/2 Stunden, nach einer anderen Angabe (45) in 2 und mehr Stunden geschehen. E i b l , U r b a s c h e k und Z o d e r (16, 17) halten eine Abkühlung von mehr als $0,5^{\circ}$ pro Minute für schädlich, während G r a h a m (21) die Temperatur um 1° pro Minute sinken läßt.

In meinen Versuchen kühlte ich die erste Fraktion jedes Ejakulates in einer halben, die zweite in einer, die dritte in zwei und die vierte in drei Stunden von $+25^{\circ}\text{C}$ (Verdünnungstemperatur) bis $+5^{\circ}\text{C}$ ab. Dies geschah durch Zugabe von kaltem Wasser und Eisstückchen zu den etwa 2 Liter fassenden Wassererbädern, in denen die Proben vorverdünnt worden waren. Die Temperatur wurde wieder im Sperma selbst kontrolliert, wobei ich auf einen gleichmäßigen Abfall achtete. Nach Erreichen von $+5^{\circ}\text{C}$ wurde der Zweitverdünner zugesetzt, das Sperma der 10-stündigen Adaptionszeit überlassen und dann tiefgekühlt. Den Sauerstoffverbrauch maß ich sofort nach dem Auftauen nach etwa 30 Stunden.

1. Versuchsreihe (Durchschnitt aus 4 Versuchen):

Abkühlung von	1/2	1	2	3	Stunden
$+25^{\circ}\text{C} - +5^{\circ}\text{C}$					

O ₂ -Verbrauch in cmm in 2 Stunden	185	167	170	154
%	100 %	90,1 %	91,9 %	83,2 %

Den höchsten Sauerstoffverbrauch nach dem Auftauen hatten die in einer halben Stunde vorgekühlten Proben. Da nun die Atmungswerte der in einer Stunde abgekühlten Proben mit denen der in zwei Stunden gekühlten auf ungefähr gleicher Höhe lagen, ja die in zwei Stunden gekühlten Proben sogar etwa höhere Werte aufwiesen, während doch die in 3 Stunden gekühlten wieder deutlich absanken, verglich ich in 2 weiteren Versuchsreihen noch einmal die Abkühlzeiten von 30 und 60 Minuten und die von 60 und 120 Minuten miteinander.

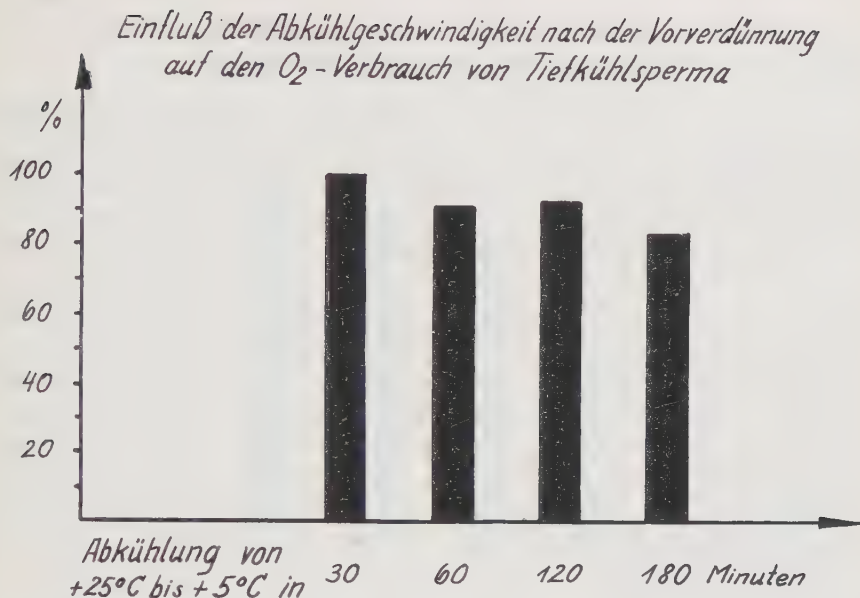
2. Versuchsreihe (Durchschnitt aus 2 Versuchen) :

Abkühlung von +25°C - +5°C	1/2	1	Stunden
O ₂ -Verbrauch in cmm in 2 Stunden	372	308	
%	100 %	81,3 %	

3. Versuchsreihe (Durchschnitt aus 4 Versuchen) :

Abkühlung von +25°C - +5°C	1	2	Stunden
O ₂ -Verbrauch in cmm in 2 Stunden	179	177	
%	100 %	98,9 %	

Auch diese Ergebnisse zeigen, daß zwar die in 1 Stunde abgekühlten Proben einen deutlichen Abfall gegenüber den in einer halben Stunde gekühlten aufweisen, die in einer Stunde gekühlten jedoch etwa die gleichen Werte wie die in 2 Stunden gekühlten ergeben. Das Optimum liegt eindeutig bei den in einer halben Stunde gekühlten Proben, so daß ein Temperaturabfall von 2/3 Grad pro Minute bei der Vorkühlung wohl die größte Schonung des Tiefkühlspermas (zumindest was seinen Sauerstoffverbrauch nach dem Auftauen betrifft) gewährleistet.



Der in der ersten Versuchsreihe ermittelte etwas höhere Wert für die in 2 Stunden gekühlten Proben dürfte keine Bedeutung haben; dieser Anstieg liegt noch innerhalb der Fehlergrenze der Methode.

5. Zeitpunkt der Nachverdünnung

Die meisten Autoren halten es für günstig, das von der Verdünnungstemperatur auf +5° C abgekühlte Sperma einige Zeit bei dieser Temperatur ruhig stehen zu lassen, bevor sie den glyzerinhaltigen zweiten Verdünnner hinzugeben; dadurch sollen die Spermien Gelegenheit haben, sich an diese Temperatur anzupassen und die Gefahr einer Schockwirkung bei der Zugabe des Zweitverdünners soll verringert werden.

So belassen V a n D e m a r k und seine Mitarbeiter (46) das Sperma 5 - 6 Stunden nach der Vorkühlung im Kühlschrank, ehe sie den Zweitverdünnner zugeben, geben allerdings als Grund hierfür an, die Wirksamkeit der Antibiotica im Verdünnner nicht einschränken zu wollen. E i b l und Z o d e r (17) lassen den vorverdünnten Samen nach der sorgfältigen Abkühlung 4 - 5 Stunden lang ruhig im Kühlschrank stehen und verdünnen dann erst zum zweiten

Mal. Auch G r o o t e n h u i s (26) wartet nach der Vorkühlung 3 - 5 Stunden, ehe er den Zweitverdünner bei $+5^{\circ}\text{C}$ dazugibt.

Die Bewegung der Spermien nach dem Auftauen ist bei Tiefkühlsamen, der eine solche Ruhepause zwischen der Vorkühlung und der zweiten Verdünnung hatte, durchaus zufriedenstellend; ob jedoch auch der Sauerstoffverbrauch und damit die Stoffwechselintensität durch das Stehenlassen bei $+5^{\circ}\text{C}$ günstig beeinflußt wird, war unbekannt und soll in den folgenden Versuchen geklärt werden.

Das Sperma wurde nach der üblichen mikroskopischen Untersuchung und der Dichtebestimmung im Wasserbad bei $+25^{\circ}\text{C}$ verdünnt und sorgfältig in 30 Minuten auf $+5^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Schon vorher war es in 4 Teile aufgeteilt worden; den glyzerinhaltigen Zweitverdünner setzte ich nun zur ersten Portion sofort, zur zweiten nach einer, zur dritten nach zwei und zur vierten nach drei Stunden Wartezeit zu. Die Temperatur wurde während der Nachverdünnung und der Wartezeit auf $+5^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die endgültige Verdünnung war wieder, wie bei den vorhergegangenen Versuchen, 1 : 19. Nach der 10-stündigen Adaptionszeit wurden die Proben tiefgeköhlt.

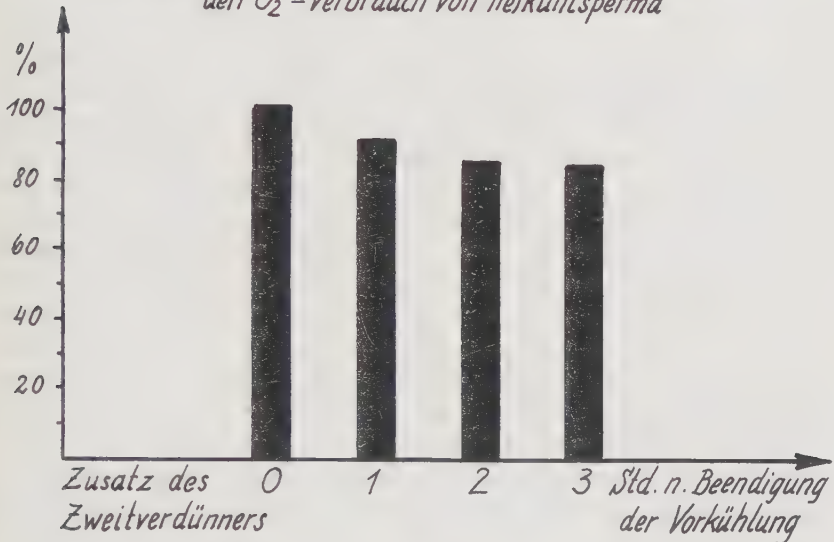
Die vier Fraktionen desselben Spermas prüfte ich stets in einem Warburgversuch auf ihren Sauerstoffverbrauch.

Durchschnitt aus 5 Versuchen:

Zusatz des Zweit- verdünners	0	1	2	3	Std. nach Vorkühlung
O_2 -Verbrauch in cmm in 2 Stunden	245	223	210	207	
%	100 %	91,0 %	85,7 %	84,5 %	

Diese Versuche zeigen, daß den eindeutig höchsten Sauerstoffverbrauch die sofort nach der Vorkühlung nachverdünnten Proben hatten. Demgegenüber machte sich bei den eine Stunde später nachverdünnten Proben bereits ein Abfall von 9 % bemerkbar; der Abfall der 2 bzw. 3 Stunden später nachverdünnten Proben war 14,3 % bzw. 15,5 %.

Einfluß des Zeitpunktes des Zweitverdünnerzusatzes auf den O₂-Verbrauch von Tiefkühlsperma



Demnach ist es also unnötig oder sogar schädlich, das verdünnte Sperma nach der Vorkühlung einige Stunden lang bei +5° C stehen zu lassen, ehe man den Zweitverdünner hinzugibt. Am besten wird der Samen sofort nach Beendigung der Vorkühlung zum zweiten Male verdünnt.

6. Abschließende Prüfung der Ergebnisse an Hand des Vergleiches von tiefgeköhlten Proben mit normal konserviertem Sperma desselben Ejakulates.

Nachdem also durch die Arbeiten von L e i d l und R ü s s e (30), U n s h e l m (43) und die beschriebenen Versuche die optimalen Bedingungen für die Behandlung von zur Tiefköhlung bestimmtem Sperma festgestellt worden sind, überprüfte ich in einer abschließenden Versuchsreihe mit Hilfe des Vergleiches von nach dieser Methode tiefgeköhlten Proben mit normal konservierten, auf die gleiche Dichte verdünnten Kontrollen desselben Ejakulates die Wirksamkeit dieses Verfahrens.

Gleichzeitig wurde versucht, aus den Ergebnissen Anhaltspunkte zu finden, die eine besondere Eignung eines Ejakulates - beziehungsweise der Ejakulate eines

bestimmten Bullen oder einer ganzen Gruppe von Bullen - zur Tiefkühlung versprechen.

Daß die Tiefkühlung auch bei schonendster Behandlung auf jeden Fall eine Schädigung des Spermias mit sich bringt, kann nicht bestritten werden. So geben P o l g e und seine Mitarbeiter an, daß mit einem Verlust von mindestens 20 % gerechnet werden muß. Es seien nur in den besten Fällen noch 80 % der ursprünglich lebenden Spermien nach dem Tiefkühlen und Auftauen voll aktiv (34, 35, 40). E i b l, U r b a s c h e k und Z o d e r (16) rechnen mit einem größeren Verlust, wenn sie schreiben: "Ein recht brauchbares Durchschnittsergebnis sind 50 % ungeschädigte, voll aktive Spermien. Es scheint, daß das Einfrieren nur die ungeschädigten und nicht physiologisch erschöpften Spermien überdauern". Die Befruchtungsrate mit Tiefkühl sperma war trotz dieses Verlustes nicht niedriger als die, die mit 24 Stunden altem normal konserviertem Sperma erzielt wurde.

D u n n und H a f s (13) prüften in einem breit angelegten Versuch die Beweglichkeit der Spermien 0 bzw. 6 Monate nach dem Gefrieren. Sie ermittelten dabei eine durchschnittliche Wiederbelebung von 71 % (nach 0 Monaten). Ihrer Schätzung nach muß jedoch bei der praktischen Arbeit mit Tiefkühlsamen mit einem Verlust von 40 - 50 % gerechnet werden, weil Ampullen mit einer weit unter dem Durchschnitt liegenden Wiederbelebung sowie ganze Ejakulate, die sich schlecht zum Tiefkühlen eignen, ausgesondert werden müssen.

Alle diese Aussagen wurden auf Grund der Beweglichkeit der einzelnen Proben gemacht. Diesem Verfahren haften jedoch naturgemäß große subjektive Fehler an. Abweichungen von 5 % sowohl nach oben als auch nach unten können mit dem Auge nicht erfaßt und müssen in Kauf genommen werden. Auch bei mehrfacher Schätzung durch verschiedene Personen kann keine unbedingte Sicherheit erreicht werden. Aus diesem Grunde fand die Beweglichkeit der Spermien bei meinen Versuchen nur am Rande Beachtung.

Die Prüfung durch Befruchtungsversuche konnte nicht vorgenommen werden, weil sie ein zu großes Versuchsmaterial voraussetzt, zu lange Zeit in Anspruch nimmt und zu kostspielig ist. Außerdem hängt der Erfolg von zu vielen Faktoren ab, die nichts mit der Qualität oder der Bearbeitung des Samens zu tun haben.

Mit der Warburgmethode dagegen können unter Umgehung von subjektiven Fehlern und mit geringem Aufwand brauchbare Aussagen über den Gefriererfolg gemacht werden. Der Vergleich der Tiefkühlproben mit normal konservierten, auf gleiche Dichte verdünnten Kontrollen vom gleichen Ejakulat bietet die Möglichkeit, die Schädigung, die das Sperma durch den Tiefkühlprozeß erlitten hat, in Prozent auszudrücken. Allerdings sind diese Zahlen nur relativ; Sperma von minderer Qualität, das schon bei der normalen Konservierung wenig befriedigende Ergebnisse bringt und naturgemäß keinen guten Erfolg bei der Tiefkühlung erwarten läßt, kann also beim Vergleich eine durchaus zufriedenstellende Prozentzahl aufweisen. Daraus kann kein Schluß auf die Qualität des Spermas gezogen werden, wohl aber auf seine Eignung zur Tiefkühlung beziehungsweise die Brauchbarkeit der angewandten Methode.

Für meine Versuche wurde folgende Versuchsanordnung benützt:
Jedes Ejakulat wurde in zwei Proben geteilt. Die erste Hälfte wurde bei $+25^{\circ}\text{C}$ mit einem Verdünner aus 3,2 % Natriumzitrat und 20 % Eidotter im Verhältnis 1 : 19 verdünnt, in 30 Minuten auf $+5^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und nach 2 - 4 Stunden Ruhezeit auf ihren Sauerstoffverbrauch im Warburgapparat geprüft. Sie diente als Kontrolle.

Die andere Hälfte wurde ebenfalls bei $+25^{\circ}\text{C}$ verdünnt, und zwar im Verhältnis 1 : 9 mit einem Verdünner, der 3,2 % Na-Zitrat und 40 % Eidotter enthielt. Die Abkühlung auf $+5^{\circ}\text{C}$ geschah wiederum in 30 Minuten. Sofort danach wurde der Tiefkühlverdünner (3,2 % Natriumzitrat + 15 % Glyzerin) im Verhältnis 1 : 1 zugegeben. Die Temperatur dieses Verdünners betrug gleichfalls $+5^{\circ}\text{C}$. Die endgültige Verdünnung war die gleiche wie in den Kontrollen. Nach der zehnstündigen Adaptionzeit wurde tiefgekühlt, und zwar gleichmäßig um 1°C pro Minute von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -79°C . Aufgetaut wurde nach frühestens 24 Stunden in Eiswasser.

Diese Methode entsprach also der als optimal ermittelten Behandlungsweise für Tiefkühlsperma.

Zur Messung der Atmung der tiefgekühlten Proben fanden dieselben Manometer und Reaktionsgefäße Verwendung wie zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauches der normal konservierten Kontrollen, welcher gleich 100 % gesetzt wurde. Somit konnte der Sauerstoffverbrauch der tiefgekühlten Proben auf diesen Wert bezogen, und die Schädigung, die das Sperma durch den Tiefkühlprozeß erlitten hat, in Prozent ausgedrückt werden.

Für diese Versuche wurden 32 Ejakulate von 19 verschiedenen Bullen aller Altersklassen herangezogen; der Sauerstoffverbrauch wurde sowohl nach einer wie auch nach 2 Stunden Beatmung im Warburgapparat errechnet, um einen Überblick über den Abfall der Atmungsintensität der tiefgekühlten Proben zu erhalten. Der Durchschnitt aus sämtlichen Versuchen ergab folgende Werte:

Durchschnitt aus 32 Versuchen:

O ₂ -Verbrauch in cmm	nach 1 Std.	nach 2 Std.
der Kontrollen	166, 1	246, 1
der tiefgekühlten Proben	129, 3	179, 4
%	77, 9 %	72, 9 %

Die Vorwärtsbewegung lag in den Tiefkühlproben im Durchschnitt bei 30 % (die besten Proben erreichten 50 %, die schlechtesten knapp 20 %), bei den Kontrollen bei 50 bis 70 %. Die besten Ejakulate ergaben Atmungswerte von etwa 94 % nach einer Stunde und 85 % nach zwei Stunden Beatmung, während die schlechtesten 65 bzw. 62 % ergaben. Dieses Durchschnittsergebnis ist als durchaus zufriedenstellend zu betrachten; allerdings macht es der Abfall der Stoffwechselintensität in der zweiten Stunde der Atmungsmessung, der bei Tiefkühlsperma bedeutend höher ist als bei normal konserviertem Sperma, notwendig, für die Besamung in der Praxis einen Zeitpunkt zu wählen, der möglichst nahe an dem Zeitpunkt der Ovulation gelegen ist.

Es ließ sich bei diesen Versuchen kein direkter Zusammenhang zwischen der geschätzten Vorwärtsbewegung der Spermien nach dem Auftauen und dem Sauerstoffverbrauch feststellen; dies mag daran liegen, daß - wie bereits erwähnt - Sperma von weniger guter Qualität schon bei der normalen Konservierung eine Schädigung erfahren haben kann, die dann in den stets relativen Prozentzahlen nicht mehr zum Ausdruck kommt. Außerdem ist es nicht bekannt, ob mit der Beweglichkeit der Spermien auch der Stoffwechsel völlig zum Erliegen kommt. Es kann durchaus die Möglichkeit bestehen, daß sich auch dem Auge unbeweglich - also tot - erscheinende Spermien noch am Sauerstoffverbrauch beteiligen.

Auch die Spermienkonzentration pro cmm verdünnten Samens (die bei der einheitlichen Verdünnung von 1 : 19 in den Grenzen von 40 000 bis 105 000 Spermien/cmm schwankte) ergab keine Beziehung zum Sauerstoffverbrauch der einzelnen Proben. Ein solcher Vergleich der verschiedenen Ejakulate untereinander mußte bei der angewandten Methode auch fragwürdig erscheinen. (Siehe: 1. Verdünnungsgrad für Tiefkühlsperma.)

Demnach scheint das Sperma alter Bullen etwas bessere Erfolge bei Tiefkühlen zu versprechen. Allerdings beträgt der Abfall des Sauerstoffverbrauches in der zweiten Stunde - verglichen mit dem Verbrauch in der ersten Stunde - bei dieser Altersgruppe 6,2 %, während er bei den Bullen von 2 1/2 bis 6 Jahren 4,5 % und bei den Jungbullen unter 2 1/2 Jahren nur 4,2 % betrug.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Für einige Punkte in der Technik der Tiefkühlung des Bullenspermas wurden optimale Werte festgestellt, und zwar diente dabei der mit der manometrischen Methode nach Warburg gemessene Sauerstoffverbrauch der wiederaufgetauten Proben als Kriterium für die Stoffwechselintensität der Spermien. Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

1. Bei einer Spermienkonzentration von 25 000 - 50 000 pro cmm verdünnten Samens ist der höchste Sauerstoffverbrauch nach dem Auftauen zu erwarten. Es muß also stets unter Berücksichtigung der ursprünglichen Dichte des Ejakulates verdünnt werden.
2. Die Verdünnung hat möglichst sofort nach der Samengewinnung zu erfolgen. Bereits eine Stunde später ist mit einem Abfall des Sauerstoffverbrauches von etwa 15 % zu rechnen, der sich nach fünf Stunden auf etwa 22 % erhöht. Dieser Abfall muß in solchen Fällen, wo aus technischen Gründen eine sofortige Verdünnung unmöglich ist, bei der Beurteilung des Tiefkühlerfolges berücksichtigt werden.
3. Die optimale Verdünnungstemperatur liegt bei + 25° C. Temperaturen von + 20° C oder + 30° C bringen keine nennenswerte Schädigung mit sich.
4. Die Vorkühlung von + 25° C bis + 5° C erfolgt am besten in 30 Minuten.
5. Der glyzerinhaltige Nachverdünner soll sofort nach Beendigung der Vorkühlung zugesetzt werden.

Der Sauerstoffverbrauch der nach der so modifizierten Tiefkühlmethode bearbeiteten Ejakulate beträgt im Vergleich zu den nicht durch Tiefkühlung konservierten Kontrollen durchschnittlich 75 %. Zusammenhänge zwischen dem Sauerstoffverbrauch und der Beweglichkeit der Spermien nach dem Auftauen und der Spermienkonzentration in den einzelnen Proben konnten nicht ermittelt werden. Ebenso wenig ergaben sich auffallende Unterschiede zwischen den Ejakulaten der verschiedenen Bullen oder etwa gleichliegende Werte für verschiedene Ejakulate derselben Bullen.

S U M M A R Y

Maximum values regarding several items of the deep-freeze technic with bull semen have been established.

The oxygen consumption of the re-thawed sperms tested by the manometrical method by Warburg served as a criterion for the intensity of metabolism of the sperms. The following results have been ascertained:

1. The highest oxygen consumption after thawing was obtained with a concentration of sperms of 25 000 - 50 000 per cmm diluted semen. For this reason the dilution has to be made regarding to the original density of the ejaculate.
2. The dilution has to be made immediately after obtaining the semen. After one hour the oxygen consumption is reduced by 15 %, increasing to about 22 % after five hours. This reduction has to be taken into consideration when judging the result of deep-freezing in cases where it is for technical reasons not possible to dilute immediately.
3. The most favourable temperature of dilution is about $+25^{\circ}\text{C}$. The damages which occur at temperatures of $+20^{\circ}\text{C}$ or $+30^{\circ}\text{C}$ are negligible.
4. The most favourable coolingtime from $+25^{\circ}\text{C}$ down to $+5^{\circ}\text{C}$ (pre-cooling) is 30 minutes.
5. The second dilutor, containing glycerine, should be added immediately after finishing the pre-cooling.
6. The oxygen-consumption of ejaculates prepared by this modified deep - freeze method reaches in the average 75 %, compared to the unfrozen controls.

Any connections between the oxygen consumption and the mobility of the sperms after thawing and the sperm concentration within the different samples was not obtained. Also there were no notable differences between the ejaculates of different bulls nor notable similarities in the different ejaculates of one single bull.

A N H A N G

Bearbeitungsanleitung für zur Tiefkühlung bestimmtes Bullensperma

Im Folgenden ist die Behandlung von Tiefkühlsperma in einzelnen Punkten aufgeführt, die nach den derzeitigen Erfahrungen den besten Erfolg verspricht.

1. Verdünnung des Spermas möglichst sofort nach der Samenabnahme.
2. Verdünnungstemperatur $+25^{\circ}\text{C}$ (Temperaturen zwischen $+20^{\circ}\text{C}$ bis $+30^{\circ}\text{C}$ sind ohne schwerwiegenden Einfluß).
3. Zusammensetzung des Vorverdünners: 60 Teile einer 2,5 %igen Natriumzitratlösung ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5 + 2\text{H}_2\text{O}$ bzw. 3,2 %ige Lösung von $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5 + 5,5 \text{ H}_2\text{O}$) und 40 Teile Eidotter.
4. Verdünnung auf eine Spermienkonzentration von 50 000 bis 100 000 pro cmm im vorverdünnten Samen.
5. Abkühlung von $+25^{\circ}\text{C}$ bis $+5^{\circ}\text{C}$ gleichmäßig in 30 Minuten (Temperaturabfall $2/3$ Grad pro Minute).
6. Zusammensetzung des Nachverdünners: Natriumzitat in derselben Konzentration wie im Vorverdünner, kein Eidotter, 15 % Glycerin.
7. Zusatz des Nachverdünners im Verhältnis 1 : 1, unfractioniert, aber langsam unmittelbar nach der Abkühlung auf $+5^{\circ}\text{C}$. Temperaturgleichheit beachten! Die endgültige Spermienkonzentration beträgt also 25 000 bis 50 000 Spermien pro cmm, die Eidotterkonzentration 20 % und die Glycerinkonzentration 7,5 %.
8. Adaptionszeit von 10 Stunden bei $+5^{\circ}\text{C}$. Schwankungen um eine oder zwei Stunden spielen kaum eine Rolle.
9. Abkühlgeschwindigkeit von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -79°C gleichmäßig 1 Grad/Minute.
10. Auftauen in Eiswasser bei 0°C .

Die optimalen Werte für die einzelnen Stufen wurden in der bereits beschriebenen Weise durch Vergleich der mit der manometrischen Methode nach Warburg gemessenen Atmungswerte der Einzelproben eines Ejakulates ermittelt, und zwar von Leidl und Rüsse (30), Leidl (in einer unveröffentlichten Arbeit), Unshelm (43) und in der vorliegenden Arbeit.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Aehnelt, E.: Verdünnungstemperatur und Nachverdünnung beim Bullensperma.
DTW 59, Beilage Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 2, 53. 1952
2. Ah, J. v.: Das Tiefgefrieren von Sperma, eine neue Methode zur Samenkonservierung für die künstliche Besamung.
Schweizer Archiv für Tierheilkunde 97: 370. 1955
3. Aubele, H.: Der Atmungskoeffizient des Bullenspermas in Beziehung zur Befruchtungsfähigkeit.
Diss. München 1958
4. Bericht des landwirtschaftlichen Versuchslaboratoriums Kopenhagen, Rolighedsvej 25: Versuche zur Tiefkühlung von Bullensamen.
5. Blackshaw, A. W., Emmens, C. W., Martin, J. and Heyting, J.:
The preparation of deep frozen semen.
The A. I. Digest, Jan. 1957
6. Bonadonna, T., Kaan, J.:
Fecondità delle bovine e numero dei nemaspermi supposti viventi per ce di materiale spermatico ed usato per la fecondazione artificiale.
Vet. ital. 6: 333. 1955
7. Bratton, R. W., Flood, J. C., Wearden, S. and Dunn, H. O.:
Fertility of bovine spermatozoa stored at minus 79° C for one week and for seventeen weeks.
J. Dairy Sci. 40: 154. 1957
8. Bratton, R. W., Foote, R. H. and Cruthers, J.:
Preliminary fertility results with frozen bovine spermatozoa.
J. Dairy Sci. 37: 651 (1954) und 38: 40 (1955)
9. Bratton, R. W., Foote, R. H., Henderson, C. R., Musgrave, S. D., Dunbar, R. S. (Jr.), Dunn, H. O. and Beardsley, J. P.:
The relative usefulness of combinations of laboratory tests

- for predicting the fertility of bovine semen.
J. Dairy Sci. 39: 1542 1956
10. Bruce, W.: The application of the low temperature storage of bull semen for artificial insemination.
III. Int. Congress on Animal Reproduction, Cambridge 1956
11. Comité voor Steriliteitsbestrijding. Belgium 1954, Veeartsenijschool - Gent. Verslag over het werkjaar 1953. Vlaam. diergeneesk. Tijdschr. 23: 67.
12. Deminatus, F.:
Die Tiefkühlung des Bullenspermas.
Diss. Hannover 1956
13. Dunn, H. O. and Hafs, C.:
A study of variation in the numbers of live sperm surviving freezing and six month storage at - 79° C.
III. Int. Congress on Animal Reproduction, Cambridge 1956
14. Dunn, H. O., Larson, G. L. and Willett, E. C.:
Preliminary breeding results with frozen semen.
J. Dairy Sci. 36: 101. 1953
15. Eibl, K.: Das Samentiefkühlverfahren in der Praxis.
Züchtungskunde, H. 2: 81. 1954
16. Eibl, K. Urbaschek, B. und Zoder, H.:
Die Tiefkühlkonservierung des Bullenspermas.
DTW 61, Beilage Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 5, 97 und 6, 109. 1954
17. Eibl, K. und Zoder, H.:
Zur Technik der Samentiefkühlung.
DTW 62, Beilage 8: 88. 1955
18. Emmens, C. W. and Martin, J.:
The controlled introduction of deep-freeze techniques into artificial insemination.
III. Int. Congress on Animal Reproduction, Cambridge 1956
19. Emmens, C. W. and Martin, J.:
Fertility of bull semen deep-frozen by two different techniques.
Aust. vet. J. 33: 63. 1957

20. Görze, R.: Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere.
Verlag M. & H. Schaper, Hannover. 1949
21. Graham, E. F. and Erickson, W. E.:
Conception results with frozen semen.
Proc. VII. Am. Conv. Nat. Ass. Art. Breed.
(NAAB), Harrisburg, Pennsylvania, Sept. 1954
22. Greiff, W.: Untersuchungen über die Verwendung von Trockenmilch
und Glykokoll in der Samenpufferung.
Diss. München 1957
23. Groot, B. de: Physiologie des Tiefgefrierens beim Bullensamen. Fort-
pflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 2: 25. 1956
24. Groot, B. de: De invloed van glycerol op het conserveren van Stieren-
sperma bij lage temperaturen (-79°).
Tijdschr. Diergeneesk 77: 892. 1952
25. Groot, B. de en Hendrikse, J.:
Een proefneming met diepvriessperma.
Tschr. Diergeneesk 79: 910. 1954
26. Grootenhuis, G.: Over de toepassing van het diepvriezen van sperma in de
praktijk.
Tijdschr. diergeneesk 78 (20): 861. 1953
27. Hafs, H. D. and Elliott, F. J.:
The effects of adding egg yolk and monosaccharides on the
survival of frozen bull spermatozoa.
J. Dairy Sci. 38: 811. 1955
28. Jakobsen, F.: Some deep-freezing methods of bull semen and their in-
fluence on fertility results.
III. Int. Congress on Animal Reproduction, Cambridge 1956
29. Küst, D. und Schätz, F.:
Die Besamung beim Rind.
Ferdinand-Enke-Verlag Stuttgart, 1954
30. Leidl, W. und Rüsse, M.:
Der Einfluß der Tiefkühlung auf den Sauerstoffverbrauch
von Bullensperma.
DTW 63, Beilage Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haus-
tierbesamung 10: 117. 1956

31. Letard, E. et Szumowski, P.:
Conservation du sperme aux basses temperatures.
Rec. Med. Vet. 130: 541 1954
32. Parkes, A. S.: Preservation of living cells and tissues at low temperatures.
III. Int. Congress on Animal Reproduction, Cambridge 1956
33. Polge, C.: Konservierung von Stiersamen bei sehr niedrigen Temperaturen.
Vortrag, gehalten bei der Fachtagung für künstliche Befruchtung am 18./19. August 1956 in Wels/Österreich
34. Polge, C. et alii:
The storage of bull semen at low temperatures.
Vet. Rec. 65: 557. 1953
35. Polge, C. and Rowson, L. E. A.:
Long-term storage of bull semen frozen at very low temperatures (- 79° C).
Report of the II. Int. Congress of Physiology and of Artificial Insemination, Vol. III, Artificial Insemination, 90.
Kopenhagen 1952
36. Polge, C. and Rowson, L. E. A.:
Results with bull semen stored at - 79° C.
Vet. Rec. 64: 851. 1952
37. Rottensteen, K. und Andersen, H.:
Fortyndingsgradens indviekning pa tyresaeds befrugtnings-
evne. 289. Beretn. Forsgslab. (Kbh.): 24 pp. 1956
38. Rowson, L. E. A.: The storage of bull semen at low temperatures.
(Symposium). Vet. Rec. 65: 559. 1953
39. Rowson, L. E. A. and Polge, C.:
Storage of bull semen at - 79° C and fertility results up
to 12 month.
Vet. Rec. 65: 677. 1953
40. Smith, A. U. and Polge, C.:
Storage of bull spermatozoa at low temperatures.
Vet. Rec. 62: 115. 1950

41. Swanson, E. W.: Diluents for bull semen and their limitations.
Proc. VII Am. Conv. Nat. Ass. Art. Breed.
(NAAB), Harrisburg, Pennsylvania, Sept. 1954
42. Ullner, W.: Gedanken zur Beurteilung des Bullenspermas.
DTW 62, Beilage Fortpflanzung, Zuchthygiene und
Haustierbesamung 5: 152. 1955
43. Unshelm, J.: Beiträge zur Technik der Spermatiefkühlung.
Diss. München 1959
44. Urbaschek, B. und Zoder, H.:
Die Samenkonservierung durch die Tiefkühlmethode.
TU 8: 448. 1953
45. Van Demark, N. L. and Kinney, W. C.:
Procedure used in freezing bull semen.
Proc. VII Am. Conv. Nat. Ass. Art. Breed.
(NAAB), Harrisburg, Pennsylvania, 1954
46. Van Demark, N. L., Miller, W. J., Kinney, W. C. Jr., Carlos Rodri-
guez, Friedmann, M. E.:
Preservation of bull semen at sub-zero temperatures.
Bulletin 621, University of Illinois, Agricult. Exp.
Stat. 1957
47. Willett, E. L.: Fertility of bull semen diluted 1 : 100 and 1 : 300
with and without antibiotics.
Kongressbericht Kopenhagen III, 126. 1952

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich es nicht versäumen, Herrn Prof. Dr. W. Baier meinen herzlichsten Dank auszusprechen für die Überlassung der Arbeit wie auch seine allzeit freundliche Unterstützung.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Privatdozenten Dr. W. Leidl und Herrn Dr. O. Haeger, der mir für einen großen Teil meiner Versuche Sperma der Bullen der Bullenprüfstation Südbayern zur Verfügung stellte.

L E B E N S L A U F

Am 13. August 1936 wurde ich, Helga Elisabeth Mayer, als Tochter des Diplomlandwirtes Dr. Hans Rudolf Mayer und seiner Ehefrau Wilhelmine, geb. Edle von Koch, in München geboren. Nach vier Jahren Volksschulbesuch in Großmain bei Salzburg und Rohrbach bei Pfaffenhofen an der Ilm trat ich im Herbst 1946 in das Mädchen-Realgymnasium am St. -Anna-Platz in München ein, wo ich im Juli 1954 die Reifeprüfung ablegte. Vom Wintersemester 1954/55 bis zum Wintersemester 1958/59 studierte ich Tiermedizin an der Universität München und unterzog mich im Frühjahr 1959 der tierärztlichen Hauptprüfung.

